

京都大学	博士 (医学)	氏名	大野美樹
論文題目	Transglutaminase 2 accelerates neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis through interaction with misfolded superoxide dismutase 1 (トランスグルタミナーゼ2はミスフォールド型スーパーオキシドジスムターゼ1との結合を介して、筋萎縮性側索硬化症の神経炎症を増悪させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は 10%が遺伝性を有しスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) の突然変異が存在する。近年孤発症例にも SOD1 の構造異常が報告されており、その分子病理機構の解明は ALS の病態理解と治療法開発に有用である。変異 SOD1 関連病態の分子基盤として SOD1 のオリゴマー形成が注目されているが、SOD1 オリゴマーの形成機構は解明されておらず、その作用部位や関連病態については不明な点が多い。トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) は、中枢神経系の細胞内外に豊富に存在する内因性架橋分子であるが ALS との関連は不明である。このため TG2 と SOD1 オリゴマー形成、ALS 病態との関与について検証した。</p> <p>不死化培養細胞 HEK293A に FLAG 標識した SOD1 と HA 標識したヒト TG2 を遺伝子導入し、免疫沈降とウェスタンブロット (WB) 法で解析したところ、TG2 は変異 SOD1 特異的に結合し、野生型 SOD1 との結合は殆ど認めなかった。また蛍光免疫組織染色法と共焦点レーザー顕微鏡観察においてプロテアソーム阻害下で出現する SOD1 凝集体と TG2 は共局在を示した。</p> <p>次に WB 法により、HEK293A 細胞内で TG2 の過剰発現が変異 SOD1 のみ不溶性分画にオリゴマー形成を促すことが示された。さらに <i>in vitro</i> で、精製 TG2 は 0.5mM 以上のカルシウム存在下に非金属配位のアポ野生型 SOD1、さらに変異型 SOD1 を架橋したが天然状態の野生型 SOD1 には作用しなかった。</p> <p>細胞外 TG2 と神経炎症との関連を検討するため、TG2 を用いて精製した可溶性 SOD1 オリゴマーを HPLC にてサイズ分画し、ミクログリア細胞株 BV2 の培養培地に添加し、炎症関連因子 (TNF-α、IL-1β、iNOS) の誘導を real-time PCR 法によって調べたところ、野生型/変異型オリゴマーはモノマー SOD1 による炎症関連因子の誘導を著明に増強した。この誘導効果はオリゴマーサイズ依存性に増加したが、一定サイズ以上では減弱した。運動ニューロンモデル細胞 NSC-34 に対して、持続的 NO 放出薬 NOC18 と TNF-α は、カスパーゼ依存的な相乗的毒性効果を呈した。</p> <p>変異 SOD1 トランスジェニックマウス (Tg マウス) 脊髄ライセートにおける TG2 発現量を WB 法で検討したところ、発症前 (20 週) で対照マウス (WT マウス) に比べ有意に増加した。さらに Tg/WT マウスの舌下神経を 24 時間結紮し、Laser capture microdissection 法によって採取した舌下神経核の TG2 発現を real-time PCR 法にて検証したところ、TG2 発現誘導は Tg/WT マウスともに軸索結紮によって増加し WT マウスでは有意差を認めた。</p> <p>さらに、発症時 Tg マウスの髄腔内に、TG2 阻害薬であるシスタミンを 42 日間持続注入したところ、体重や握力の低下抑制と、進行抑制を示した。また WB 法により脊髄ライセートの SOD1 オリゴマーと炎症マーカーである Mac2、COX2 発現量が有意な減少を確認した。</p> <p>以上の結果は、TG2 が病的状態で誘導され、ミスフォールド型の SOD1 を特異的に認識しオリゴマー形成をする内因性分子であることを示している。さらに近年 SOD1 が細胞外に分泌されることが明らかになっており、細胞外での TG2 による SOD1 オリゴマー形成が、変異 SOD1 を有する家族性 ALS における神経炎症に深く関わっている可能性がある。Tg マウスに対するシスタミンの有効性から、TG2 は家族性 ALS の新たな治療標的として有望であると考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) は家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であり、SOD1 の高分子化が病因として注目されている。そこで内因性架橋化酵素トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) について、SOD1 のオリゴマー化や ALS 病態との関連を検証した。

TG2 は細胞内で変異 SOD1 優位に結合し *in vitro* 実験系で変異型やアポ野生型 SOD1 をカルシウム依存性にオリゴマー化した。また SOD1 オリゴマーはミクログリア細胞株培養培地への投与で炎症関連物質を誘導した。免疫染色によりマウス脊髄運動ニューロンでの TG2 発現を認め、野生型マウスの舌下神経結紮による舌下神経核の TG2 の mRNA 発現上昇と、変異 SOD1 トランスジェニックマウス発症前脊髄の TG2 の蛋白質量増加を認めた。同マウスに TG2 阻害薬の髄腔内持続投与を行った結果、進行抑制と罹病期間延長を認め、脊髄ライセート中の SOD1 オリゴマー形成と炎症マーカー発現が抑制された。以上より、TG2 はミスフォールド型の SOD1 を基質としてオリゴマーを形成し、ALS における神経炎症に関与している可能性が示され、TG2 は ALS の治療標的となりえると考えられた。

以上の研究は、ALS における内因性架橋化酵素による SOD1 オリゴマー形成と神経炎症の解明に貢献したことにより、ALS の病態機序の解明、治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文が博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 12 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降